

09/806724  
PCT/FR 99/02551

REC'D 08 NOV 1999

WIPO

PCT

FR 99/2551

# BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

## COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 05 OCT. 1999

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

## PRIORITY DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

SIEGE  
26 bis. rue de Saint Petersburg  
75800 PARIS Cédex 08  
Téléphone : 01 53 04 53 04  
Télécopie : 01 42 93 59 30

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

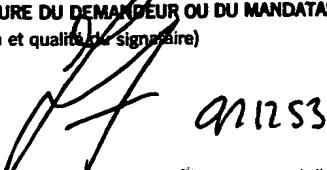
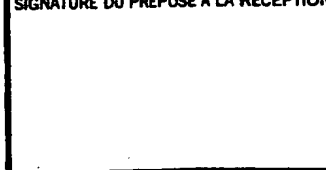
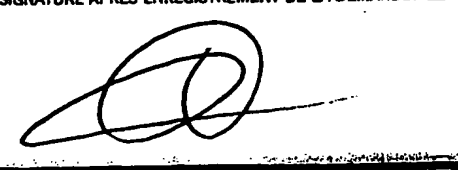


**REQUÊTE EN DÉLIVRANCE**

Confirmation d'un dépôt par télécopie ☐

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08  
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

Réservé à l'INPI DATE DE REMISE DES PIÈCES <b>22/10/98</b> N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL DÉPARTEMENT DE DÉPÔT <b>95</b> <b>98 13279 -</b> DATE DE DÉPÔT <b>22 OCT. 1998</b>		1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE  <b>CABINET REGIMBEAU</b> <b>26, Avenue Kléber</b> <b>75116 PARIS</b>									
2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle <input checked="" type="checkbox"/> brevet d'invention <input type="checkbox"/> demande divisionnaire <input type="checkbox"/> certificat d'utilité <input type="checkbox"/> transformation d'une demande de brevet européen <input type="checkbox"/> demande initiale <input type="checkbox"/> brevet d'invention <input type="checkbox"/> certificat d'utilité n° Établissement du rapport de recherche <input type="checkbox"/> différé <input checked="" type="checkbox"/> immédiat Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance <input type="checkbox"/> oui <input type="checkbox"/> non		n° du pouvoir permanent <b>237422 D17794 JX</b> références du correspondant <b>01 45 00 92 02</b> téléphone date									
Titre de l'invention (200 caractères maximum) <b>Matériel biologique pour la préparation de compositions pharmaceutiques destinées au traitement de mammifères</b>											
3 DEMANDEUR (S) n° SIREN Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination <b>TRANSGENE S.A.</b>		code APE-NAF Forme juridique <b>SOCIÉTÉ ANONYME</b>									
Nationalité (s) <b>Française</b> Adresse (s) complète (s) <b>11, rue de Molsheim 67000 STRASBOURG</b>		Pays <b>FR</b>									
4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs <input type="checkbox"/> oui <input checked="" type="checkbox"/> non Si la réponse est non, fournir une désignation séparée											
5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES <input type="checkbox"/> requise pour la 1ère fois <input type="checkbox"/> requise antérieurement au dépôt ; joindre copie de la décision d'admission											
6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE <table border="1"> <thead> <tr> <th>pays d'origine</th> <th>numéro</th> <th>date de dépôt</th> <th>nature de la demande</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td> </td> <td> </td> <td> </td> <td> </td> </tr> </tbody> </table>				pays d'origine	numéro	date de dépôt	nature de la demande				
pays d'origine	numéro	date de dépôt	nature de la demande								
7 DIVISIONS antérieures à la présente demande n° date n° date											
8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (nom et qualité du signataire) 		SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION 									
SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI 											



# BREVET D'INVENTION, CERTIFICAT D'UTILITE

## DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR

(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

### DEPARTEMENT DES BREVETS

26bis, rue de Saint-Petersbourg  
75800 Paris Cédex 08  
Tél. : 01 53 04 53 04 - Télécopie : 01 42 93 59 30

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

98 13279

TITRE DE L'INVENTION : Matériel biologique pour la préparation de compositions pharmaceutiques destinées au traitement de mammifères

LE(S) SOUSSIGNÉ(S)

TRANSGENE S.A.  
11, rue de Molsheim 67000 STRASBOURG

DÉSIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique) :

ACRES Bruce  
10, rue Jean Hermann  
67000 STRASBOURG, FR

PAUL Stéphane  
7, rue du Vieux Marché aux  
Poissons  
67000 STRASBOURG, FR

NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (~~société~~ d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire

10 septembre 1999

CABINET REGIMBEAU

# DOCUMENT COMPORTANT DES MODIFICATIONS

PAGE(S) DE LA DESCRIPTION OU DES REVENDICATIONS OU PLANCHE(S) DE DESSIN			R.M.*	DATE DE LA CORRESPONDANCE	TAMPON DATEUR DU CORRECTEUR
Modifiée(s)	Supprimée(s)	Ajoutée(s)			
26			X	23.02.99	19 MAI 1999 - S R

Un changement apporté à la rédaction des revendications d'origine, sauf si celui-ci découle des dispositions de l'article R.612-36 du code de la Propriété Intellectuelle, est signalé par la mention «R.M.» (revendications modifiées).

MATERIEL BIOLOGIQUE POUR LA PREPARATION DE COMPOSITIONS  
PHARMACEUTIQUES DESTINEES AU TRAITEMENT DE MAMMIFERES

La présente invention concerne le domaine de la thérapie  
5 génique appliquée à l'immunothérapie spécifique, plus  
particulièrement dans le cadre de traitements de maladies dont  
l'agent responsable est un organisme pathogène, tel que  
notamment un agent bactérien, parasitaire ou viral, ou dans le  
cadre du traitement du cancer. Plus particulièrement,  
10 l'invention concerne le transfert dans des cellules tumorales  
ou infectées par un agent pathogène, de séquences d'acide  
nucléique codant pour tout ou partie d'anticorps de sorte que  
les cellules génétiquement modifiées par ces séquences d'acide  
nucléique expriment à leur surface lesdits anticorps, et plus  
15 particulièrement des anticorps capables de se fixer à un  
polypeptide présent à la surface d'une cellule effectrice  
cytotoxique ou d'un lymphocyte T helper et impliqué dans le  
procédé d'activation d'une telle cellule.

Depuis longtemps, la thérapie génique a été proposée pour  
20 corriger les désordres observés dans le cadre des maladies  
génétiques. Ces maladies s'expliquent en particulier par un  
disfonctionnement de l'expression de gènes spécifiques ou par  
l'expression de polypeptides mutés non fonctionnels dans au  
moins un type cellulaire. La thérapie génique consiste dans ce  
25 cas à transférer dans des cellules cibles spécifiques extraites  
puis réintroduites dans le corps humain, ou directement dans les  
organes affectés, l'information génétique capable de corriger  
le défaut observé. Il pourra s'agir par exemple du gène codant  
pour la protéine CFTR dans le cas de la mucoviscidose ou du gène  
30 codant pour la dystrophine dans le cas de la myopathie de  
Duchenne. Dans le cadre de cette approche, l'information  
génétique est introduite soit *in vitro* dans une cellule extraite  
de l'organe, la cellule modifiée étant ensuite réintroduite dans  
l'organisme (procédé *ex vivo*), soit directement *in vivo* dans le  
35 tissu approprié. De nombreuses publications décrivent la mise  
en oeuvre de protocoles de thérapie génique afin d'obtenir dans  
les cellules cibles l'expression d'une protéine présentant un

intérêt thérapeutique par introduction de l'information génétique correspondante.

Toutefois, l'intérêt de ce type de thérapie ne se borne pas au traitement des affections purement génétiques et peut également permettre l'élimination de tumeurs, ou d'agents pathogènes, tels que les agents bactériens ou viraux, ou de cellules infectées par de tels agents pathogènes, ou à défaut de retarder leur progression.

La réponse immune dirigée contre un antigène spécifique peut être divisée en deux catégories distinctes, l'une mettant en jeu les anticorps (réponse immune de type humoral), l'autre les cellules effectrices cytotoxiques telles que par exemple les macrophages, les lymphocytes cytotoxiques (CTL) ou les cellules tueuses (NK) ainsi que les lymphocytes T helper, notamment les LTCD4 (réponse immune de type cellulaire). Plus particulièrement, les deux types de réponses se distinguent en ce que les anticorps reconnaissent les antigènes sous leur forme tridimensionnelle alors que les lymphocytes T, par exemple, reconnaissent des portions peptidiques desdits antigènes, associés à des glycoprotéines codées par les gènes du complexe majeur d'histocompatibilité (ou CMH), notamment les gènes du complexe majeur d'histocompatibilité de type I qui sont exprimés de façon ubiquitaire à la surface des cellules ou les gènes du complexe majeur d'histocompatibilité de type II qui sont exprimés de façon spécifique à la surface des cellules impliquées dans la présentation des antigènes (APC).

Selon un premier aspect, la réponse immune de type cellulaire est caractérisée en ce que les cellules T de type CD4+ (cellules T «helper»), suite à un phénomène d'activation bien connu (pour une revue voir Alberola-Ila, 1997, Annu. Rev. Immunol., 15, 125-154) produisent des cytokines qui à leur tour induisent la prolifération de cellules APC capables de produire lesdites cytokines ; la différenciation cellulaire des lymphocytes B capables de produire des anticorps spécifiques ; et la stimulation des lymphocytes T cytotoxiques (CTL). Selon un second aspect de la réponse immune cellulaire, les cellules effectrices cytotoxiques telles que par exemple les lymphocytes

de type CD8+ (CTL) sont activés a) après interaction avec des peptides antigéniques fixés sur et présentés par les glycoprotéines portées par les cellules ubiquitaires et codées par les gènes appartenant au système CMH I, et b) éventuellement  
 5 par les cytokines produites par les CD4+. Les CTL ainsi activés sont alors capables de détruire les cellules exprimant ledit peptide antigénique.

Dans le cas particulier des cancers, Hellstrom et al., (1969, Adv. Cancer Res. 12, 167-223) ont montré que la défense  
 10 de l'organisme à l'égard des tumeurs repose tout particulièrement sur la réponse immunitaire mettant en jeu les lymphocytes T, notamment les lymphocytes T cytotoxiques. Toutefois, de nombreux travaux ont montré que la plupart de ces effecteurs immunitaires, spécifiques ou non, sont inefficaces  
 15 pour permettre l'élimination ou l'arrêt de progression d'une tumeur. C'est la raison pour laquelle il est souhaitable de disposer d'une méthode de stimulation de la réponse immune dirigée contre les tumeurs, et plus particulièrement de la réponse faisant intervenir les lymphocytes cytotoxiques CTL,  
 20 afin de disposer de méthodes de prévention ou de traitement des états cancéreux plus efficaces. De manière identique, il a été montré que le système immunitaire est souvent inefficace dans le cas d'infections, virales notamment, voir par exemple le cas des infections dues au VIH (Virus de l'Immunodéficience  
 25 Humaine).

Selon une première alternative, il a été proposé d'adapter les procédés de thérapie génique déjà bien connus et de transférer dans les cellules cibles, plus particulièrement les cellules cancéreuses, des gènes immunostimulateurs  
 30 (immunothérapie) susceptibles d'induire ou d'activer une réponse immune à médiation cellulaire à l'égard de la tumeur, de gènes codant pour les cytokines (Colombo et al., 1994, Immunology Today, 15, 48-51), de gènes cytotoxiques conférant une toxicité aux cellules les exprimant, par exemple le gène tk du virus  
 35 Herpes Simplex de type 1 (HSV-1), ou d'anti-oncogènes, tels que par exemple le gène associé au rétinoblastome ou p53, ou de polynucléotides capables d'inhiber l'activité d'un oncogène, tels que par exemple les molécules antisens ou les ribozymes



capables de dégrader les ARN messagers spécifiques des oncogènes. Cependant, dans la majorité des cas, les cellules ainsi modifiées manquent de spécificité vis-à-vis de la tumeur et ne permettent pas une approche thérapeutique satisfaisante.

5 Une autre approche a également été proposée alliant les avantages de la thérapie génique et la mise en oeuvre d'anticorps spécifiques. Au cours des dernières années de nombreux antigènes tumoraux ont été caractérisés qui ont plus particulièrement permis l'identification d'anticorps, notamment  
10 d'anticorps monoclonaux spécifiques de ces antigènes. Par ailleurs, la production *in vitro* d'anticorps, de fragments d'anticorps ou de dérivés d'anticorps tels que les anticorps chimères, par génie génétique, dans des cellules eucaryotes a été décrite (EP 120 694 ou EP 125 023). Ainsi, de nombreuses  
15 stratégies thérapeutiques ont été proposées, par exemple pour le traitement ou la prévention de lymphomes B (Kefenof et al., 1993, Current Opinion in Immunology, 5, 740-744), reposant sur l'administration au patient d'anticorps thérapeutiques ciblant des antigènes tumoraux afin de neutraliser l'agent causal de la  
20 maladie. Malheureusement, ces anticorps bien que très utiles pour la détection et le diagnostic des cancers se sont révélés non satisfaisants d'un point de vue thérapeutique car ils conduisent, par exemple, à des réactions immunes limitées, dirigées uniquement à l'encontre d'épitopes immunodominants ou  
25 contre des antigènes présentant une grande variabilité.

La demande de brevet internationale (WO 94/29446) décrit l'expression intracellulaire de séquences d'ADN codant pour des anticorps. Cette approche permet d'envisager une thérapie génique reposant sur le ciblage de composants cellulaires non  
30 accessibles par les méthodes de vaccination et se caractérise en ce que l'approche décrite n'implique pas le développement d'une réponse immunitaire, agit intracellulairement et par conséquent ne permet pas le traitement efficace de tumeurs.

La demande de brevet internationale (WO 98/31808)  
35 concerne au contraire l'expression *in vivo* de gènes codant pour des anticorps ou des fragments d'anticorps par des cellules capables de sécréter lesdits anticorps dans la circulation

sanguine du mammifère porteur des cellules génétiquement modifiées par le gène codant pour l'anticorps. L'avantage de cette invention repose sur la possibilité de maintenir sur le long terme un niveau basal d'anticorps dans le patient traité.

- 5 Nous avons maintenant montré qu'il est possible de rediriger la réponse immunitaire cellulaire en exprimant à la surface de cellules cibles, notamment tumorales ou infectées par un agent pathogène, tout ou partie d'un anticorps capable de se fixer à un polypeptide présent à la surface de cellules effectrices cytotoxiques ou de lymphocytes T helper. Plus particulièrement, nous avons montré que selon la présente invention, ces cellules cibles génétiquement modifiées permettent de diriger l'activation des cellules effectrices cytotoxiques ou de lymphocytes T helper, d'augmenter l'effet
- 10 cytotoxique de ces cellules, notamment activées, à l'égard des cellules cibles, de dynamiser la réponse immune à médiation cellulaire se produisant naturellement à l'égard des cellules tumorales ou infectées, génétiquement modifiées ou non. Ceci peut ainsi se traduire par la lyse et l'élimination desdites
- 15 cellules cibles, des cellules voisines et à terme par l'élimination de la tumeur ou de l'infection.

La présente invention concerne en premier lieu un matériel biologique pour la préparation de compositions pharmaceutiques destinées au traitement de mammifères

25 comprenant :

- soit au moins une séquence d'acide nucléique contenant au moins un gène d'intérêt thérapeutique et des éléments assurant l'expression dudit gène *in vivo* dans des cellules cibles destinées à être génétiquement modifiées par ladite séquence d'acide nucléique ;
- 30

- soit au moins une cellule de mammifère ne produisant pas naturellement des anticorps et génétiquement modifiée *in vitro* par au moins une séquence d'acide nucléique précédente, caractérisé en ce que ledit gène d'intérêt thérapeutique
- 35 code pour tout ou partie d'un anticorps qui sera exprimé à la surface de ladite cellule de mammifère et en ce que l'edit

anticorps est capable de se fixer à un polypeptide présent à la surface d'une cellule effectrice cytotoxique ou d'un lymphocyte T helper, et impliqué dans le procédé d'activation d'une telle cellule.

5 Par «séquence d'acide nucléique», on entend désigner un fragment d'ADN et/ou d'ARN, double brin ou simple brin, linéaire ou circulaire, naturel isolé ou de synthèse, désignant un enchaînement précis de nucléotides, modifiés ou non, permettant de définir un fragment ou une région d'un acide nucléique sans  
10 limitation de taille. Selon un mode de réalisation préféré, il s'agit d'un acide nucléique choisi parmi le groupe consistant en un cADN ; un ADN génomique ; un ADN plasmidique ; un ARN messager.

Selon l'invention, ladite «séquence d'acide nucléique»  
15 comprend au moins un «gène d'intérêt thérapeutique» et des éléments d'expression dudit gène d'intérêt. Un tel «gène d'intérêt thérapeutique» code notamment pour tout ou partie d'un anticorps transmembranaire natif, ou pour un dérivé d'un tel anticorps, pour autant que ledit anticorps, fragment ou dérivé  
20 d'anticorps soit exprimé à la surface de la cellule cible de mammifère génétiquement modifiée et en ce que ledit anticorps est capable de se fixer à un polypeptide présent à la surface d'une cellule effectrice cytotoxique ou d'un lymphocyte T helper et impliqué dans le procédé d'activation d'une telle cellule.

25 Plus particulièrement, par «fragment» d'anticorps on entend désigner les fragments F(ab)<sub>2</sub>, Fab', Fab, sFv (Blazar et al., 1997, Journal of Immunology, 159, 5821-5833 ; Bird et al., 1988, Science, 242, 423-426) d'un anticorps natif et par «dérivé» par exemple un dérivé chimérique d'un tel anticorps  
30 (voir par exemple les chimères les anticorps anti CD3 Souris/Homme dans Arakawa et al., 1996, J. Biochem., 120, 657-662 ou les immunotoxines telles que sFv-toxine de Chaudary et al., 1989, Nature 339, 394-397). Par «anticorps transmembranaire» on entend désigner un anticorps dont au moins la  
35 région fonctionnelle capable de reconnaître et de se fixer à son antigène spécifique est exprimée à la surface des cellules cibles pour permettre lesdites reconnaissance et fixation. Plus particulièrement, les anticorps selon la présente invention

consistent en des polypeptides de fusion comprenant les amino acides définissant ladite région fonctionnelle et une séquence d'amino acides (polypeptide transmembranaire) permettant l'ancrage au sein de la double couche lipidique membranaire de la cellule cible ou à la surface externe de cette bi-couche. Les séquences nucléiques codant pour de nombreux polypeptides transmembranaires sont décrites dans la littérature. Selon un cas préféré de l'invention, ledit polypeptide transmembranaire est sélectionné parmi le groupe consistant en une glycoprotéine, une lipoprotéine, en un récepteur tel que tout ou partie des complexes évoqués plus loin dans la demande (CD4, Fc, gp160 du VIH par exemple), et plus particulièrement parmi le groupe consistant en la glycoprotéine du virus de la rage (demande de brevet français n° FR 97 09152), le CD4 (Weijtens et al., 1998, Gene Therapy, 5, 1195-1203), la gp160, le Fc. Selon un cas tout à fait avantageux, la séquence d'acide nucléique codant pour la chaîne lourde de l'anticorps sera fusionnée avec la séquence d'acide nucléique codant pour undit polypeptide transmembranaire.

Par «éléments assurant l'expression dudit gène *in vivo*», on entend désigner les éléments nécessaires afin d'assurer l'expression dudit gène après son transfert dans une cellule cible. Il s'agit notamment des séquences promotrices et/ou des séquences de régulation efficaces dans ladite cellule, et éventuellement les séquences requises pour permettre l'expression à la surface des cellules cibles dudit polypeptide. Le promoteur utilisé peut être un promoteur viral, ubiquitaire ou spécifique de tissu ou encore un promoteur synthétique. A titre d'exemple, on mentionnera les promoteurs tels que les promoteurs des virus RSV (Rous Sarcoma Virus), MPSV, SV40 (Simian Virus), CMV (Cytomegalovirus) ou du virus de la vaccine, les promoteurs du gène codant pour la créatine kinase musculaire, pour l'actine, pour le surfactant pulmonaire. Il est en outre possible de choisir une séquence promotrice spécifique d'un type cellulaire donné, ou activable dans des conditions définies. La littérature procure un grand nombre d'informations relatives à de telles séquences promotrices. Par ailleurs, ledit acide nucléique peut comprendre au moins deux séquences,

identiques ou différentes, présentant une activité de promoteur transcriptionnel et/ou au moins deux gènes, identiques ou différents, situés l'un par rapport à l'autre de manière contiguë, éloignée, dans le même sens ou en sens inverse, pour  
 5 autant que la fonction de promoteur transcriptionnel ou la transcription desdits gènes ne soit pas affectée. De même, dans ce type de construction d'acide nucléique, il est possible d'introduire des séquences nucléiques «neutres» ou introns qui ne nuisent pas la transcription et sont épissées avant l'étape  
 10 de traduction. De telles séquences et leurs utilisations sont décrites dans la littérature (WO 94/29471). Ledit acide nucléique pourra également renfermer des séquences requises pour le transport intracellulaire, pour la réplication et/ou pour l'intégration, pour la transcription ou la traduction. De telles  
 15 séquences sont bien connues de l'homme de l'art. Par ailleurs, les acides nucléiques utilisables selon la présente invention peuvent également être des acides nucléiques modifiés de sorte qu'il ne leur est pas possible de s'intégrer dans le génome de la cellule cible ou des acides nucléiques stabilisés à l'aide  
 20 d'agents, tels que par exemple la spermine, qui en tant que tels n'ont pas d'effet sur l'efficacité de la transfection.

Selon un premier mode de réalisation de l'invention, la séquence d'acide nucléique est une séquence d'ADN ou ARN nue, c'est à dire libre de tout composé facilitant son introduction  
 25 dans les cellules (transfert de séquence d'acide nucléique). Toutefois, afin de favoriser son introduction dans les cellules cibles afin d'obtenir les cellules génétiquement modifiées de l'invention, cette séquence d'acide nucléique peut être sous la forme d'un vecteur, et plus particulièrement sous la forme d'un  
 30 vecteur viral tel que par exemple un vecteur adénoviral, rétroviral, un vecteur dérivé d'un poxvirus, notamment dérivé du virus de la vaccine ou du Modified Virus Ankara (MVA) ou d'un vecteur non-viral tel que par exemple un vecteur consistant en au moins une dite séquence d'acide nucléique complexée ou  
 35 conjuguée à au moins une molécule ou substance porteuse sélectionnée parmi le groupe consistant en un amphiphile cationique, notamment un lipide cationique, un polymère cationique ou neutre, un composé polaire protique notamment

choisi parmi le propylène glycol, le polyéthylène glycol, le glycérol, l'éthanol, la 1-méthyl L -2-pyrrolidone ou leurs dérivés, et un composé polaire aprotique notamment choisi parmi le diméthylsulfoxyde (DMSO), le diéthylsulfoxyde, le di-n-propylsulfoxyde, le diméthylsulfone, le sulfolane, la diméthylformamide, le diméthylacetamide, la tétraméthylurée, l'acétonitrile ou leurs dérivés.

Par ailleurs, de tels vecteurs peuvent en outre comprendre des éléments de ciblage pouvant permettre de diriger le transfert de séquence d'acide nucléique vers certains types cellulaires ou certains tissus particuliers (cellules tumorales, cellules de l'épithélium pulmonaire, cellule hématopoïétique, cellule musculaire, cellule nerveuse...). Ils peuvent également permettre de diriger le transfert d'une substance active vers certains compartiments intracellulaires préférés tels que le noyau et les mitochondries, par exemple. Il peut en outre s'agir d'éléments facilitant la pénétration à l'intérieur de la cellule ou la lyse des endosomes. De tels éléments de ciblage sont largement décrits dans la littérature. Il peut par exemple s'agir de tout ou partie de lectines, de peptides, notamment le peptide JTS-1 (voir demande de brevet WO 94/40958), d'oligonucléotides, de lipides, d'hormones, de vitamines, d'antigènes, d'anticorps, de ligands spécifiques de récepteurs membranaires, de ligands susceptibles de réagir avec un anti-ligand, de peptides fusogéniques, de peptides de localisation nucléaire, ou d'une combinaison de tels composés. En particulier, il peut s'agir de résidus galactosyl permettant de cibler le récepteur des asialoglycoprotéines à la surface des cellules hépatiques, de ligands pouvant interagir avec des récepteurs tels que des récepteurs de facteurs de croissance, des récepteur de cytokines, de lectines, de protéines d'adhésion, il peut également s'agir d'un fragment d'anticorps tel que le fragment Fab, d'un peptide fusogénique INF-7 dérivé de la sous unité HA-2 de l'hémagglutinine du virus influenza (Planck et al., 1994, J. Biol. Chem. 269, 12918-12924), d'un signal de localisation nucléaire dérivé de l'antigène T du virus SV40 ou de la protéine EBNA-1 du virus Epstein Barr.

Selon l'invention, l'anticorps exprimé à la surface des cellules cibles est capable de se fixer à un polypeptide présent à la surface d'une cellule effectrice cytotoxique ou d'un lymphocyte T helper, notamment un lymphocyte T helper CD4, et

5 impliqué dans le procédé d'activation d'une telle cellule, et plus particulièrement à un récepteur directement impliqué dans un tel procédé. Comme cela est décrit précédemment, ce phénomène d'activation des cellules effectrices cytotoxiques ou de lymphocytes T helper est un élément déterminant de la réaction

10 immunitaire à médiation cellulaire. Toutefois, il convient de remarquer que dans le cadre de la mise en oeuvre de la présente invention, il n'est pas indispensable que le procédé d'activation ait lieu après la fixation par l'anticorps exprimé selon l'invention à la surface des cellules cibles. En effet,

15 conformément à l'invention, cet anticorps peut également se lier aux peptides tels que définis mais présents sur des cellules effectrices cytotoxiques ou de lymphocytes helper déjà activés. Par «cellules effectrices cytotoxiques» on entend désigner les macrophages, les lymphocytes T cytotoxiques (TCL) et les

20 cellules tueuses (NK), ainsi que leurs cellules dérivées telles que par exemple les LAK, (Versteeg, 1992, Immunology Today, 13, 244-247 ; Brittende et al., 1996, Cancer 77, 1226-1243 ; Poplack et al., 1976, Blood 48, 809-816). Par «lymphocytes T helper», on entend désigner notamment les CD4 qui permettent après

25 activation la sécrétion de facteurs d'activation des cellules effectrices de la réponse immune (voir plus avant). Les polypeptides, et notamment les récepteurs, exprimés à la surface de ces cellules et qui sont impliqués dans l'activation de telles cellules consistent notamment en tout ou partie du

30 complexe TCR, plus particulièrement le TCR- $\alpha$ , le TCR- $\beta$  ou le CD3, tout ou partie des complexes CD8, CD4, CD28, LFA-3, 4-1BB (Melero et al., 1998, Eur. J. Immunol., 28, 1116-1121), CD47, CD2, CD1, CD9, CD45, CD30, CD40, tout ou partie des récepteurs de cytokines (Finke et al., 1998, Gene Therapy, 5, 31-39),

35 telles que IL-7, IL-4, IL-2, IL-15 ou GM-CSF, tout ou partie du complexe récepteur des cellules NK tel que par exemple Val4NKT (Kawano et al., 1998, Immunology, 95, 5690-5693), NKAR, Nkp46 (Pessino et al., 1998, J. Exp. Med., 188, 953-960), Nkp44, tout ou partie des récepteurs de macrophages tels que par exemple le

récepteur Fc (Deo et al., 1997, Immunology Today, 18, 127-135). Selon un mode de réalisation particulier, il est également possible d'envisager de modifier génétiquement, notamment *in vivo*, les cellules effectrices cytotoxiques ou les lymphocytes T helper de façon à ce qu'elles expriment à leur surface un polypeptide, naturellement non exprimé par ces cellules, et capable d'induire le procédé d'activation de telles cellules, par l'introduction dans ces cellules de séquences d'acide nucléique renfermant le gène codant pour un tel polypeptide.

10 Conformément à la présente invention, il est alors possible de sélectionner une séquence d'acide nucléique contenant un gène d'intérêt thérapeutique codant pour tout ou partie d'un anticorps susceptible d'être exprimé à la surface des cellules cibles du patient à traiter, ledit anticorps étant capable de

15 se fixer à un tel polypeptide naturellement non exprimé par ces cellules effectrices cytotoxiques ou lymphocytes T helper.

Plus particulièrement, la présente invention repose sur la possibilité de cloner les gènes codant pour tout ou partie d'un anticorps et d'exprimer ledit anticorps dans des cellules

20 après transfert desdits gènes dans lesdites cellules à partir des vecteurs tels que décrits précédemment. La littérature propose un grand nombre d'exemples de gènes codant pour des anticorps capables de réagir avec de tels polypeptides ou récepteurs. Il est à la portée de l'homme de l'art d'obtenir les

25 séquences d'acides nucléiques codant pour de tels anticorps.

Citons pour exemple les gènes codant pour les chaînes légère et lourde de l'anticorps YTH 12.5 (anti CD3) (Routledge et al., 1991, Eur. J. Immuno. 21, 2717-2725), de l'anti CD3 selon Arakawa et al., 1996, J. Biochem., 120, 657-662). Les séquences

30 d'acide nucléique de tels anticorps sont aisément identifiables à partir des bases de données communément utilisées par l'homme du métier.

Il est également possible, à partir d'hybridomes disponibles auprès de l'ATCC et qui sécrètent des anticorps

35 spécifiques de polypeptides présents à la surface de cellules effectrices cytotoxiques ou de lymphocytes T helper et impliqués dans le procédé d'activation de telles cellules (par exemple un hybridome excrétant des immunoglobulines G $\gamma$ 2b+k dirigées contre



les récepteurs du TCR), de cloner les séquences d'acides nucléiques codant pour les chaînes lourdes et/ou légères de ces différents anticorps par les méthodes d'amplification telles que la RT-PCR à l'aide d'oligonucléotides spécifiques ou les techniques mettant en oeuvre des banques de cADN (Maniatis et al., 1982, Molecular cloning. A laboratory manual. C.S.H. Laboratory, Cold Spring Harbor, New York). Les séquences ainsi clonées sont alors disponibles pour leur clonage dans des vecteurs. Selon un cas préféré de l'invention, la séquence d'acide nucléique codant pour la chaîne lourde de l'anticorps est fusionnée par recombinaison homologue avec la séquence d'acide nucléique codant pour un polypeptide transmembranaire tel que la glycoprotéine rabique (ces techniques de biologie moléculaires sont parfaitement décrites dans la demande de brevet français n° FR 97 09152) ou la gp160 (Polydefkis et al., 1990, J. Exp. Med., 171, 875-887).

Parmi les cellules cibles de mammifère que l'invention se propose d'éliminer ou de limiter dans leur progression, on peut citer plus spécifiquement les cellules tumorales, les cellules infectées par un agent pathogène viral ou les cellules infectées par un agent pathogène bactérien. Selon l'invention, l'expression à la surface de ces cellules de tout ou partie d'un anticorps capable de se fixer à un polypeptide présent à la surface d'une cellule effectrice cytotoxique ou d'un lymphocyte T helper et impliqué dans le procédé d'activation d'une telle cellule, permet de diriger la réponse immune cytotoxique vers une cible donnée, et plus particulièrement de diriger cette réponse au niveau d'une tumeur ou d'un foyer infectieux.

A titre d'«agent pathogène viral» on peut par exemple citer le virus VIH, EBV, CMV, le virus de l'hépatite et les papillomavirus. Par «agent pathogène parasitaire», on peut par exemple citer *Leishmania leishmaniae* et *Plasmodium falciparum*.

Selon un mode de réalisation particulier, l'invention concerne un matériel biologique constitué par au moins une cellule cible, telle que notamment une cellule tumorale ou une cellule infectée par un agent pathogène viral, ne produisant pas naturellement des anticorps, sous une forme permettant leur

administration dans l'organisme d'un mammifère, humain ou animal, ainsi qu'éventuellement leur culture préalable, ladite cellule étant génétiquement modifiée *in vitro* par au moins une séquence d'acide nucléique contenant au moins un gène codant pour tout ou partie d'un anticorps exprimé à la surface de ladite cellule cible, et ledit anticorps étant capable de se fixer à un polypeptide présent à la surface d'une cellule effectrice cytotoxique ou d'un lymphocyte T helper tel que ceux précédemment décrits. Plus particulièrement, ladite cellule cible provient soit du mammifère à traiter, soit d'un autre mammifère que celui à traiter. Dans ce dernier cas, il convient de noter que ladite cellule cible aura subi un traitement la rendant compatible avec le mammifère à traiter. Selon un cas préféré, par «mammifère» on entend désigner un mammifère humain.

Un tel matériel biologique, lorsqu'il est administré à un patient, et plus particulièrement administré par voie intratumorale, est capable d'induire chez celui-ci une réponse immunitaire à médiation cellulaire pouvant conduire à la production de cytokines et à l'effet cytotoxique de cellules effectrices qui se traduisent non seulement par l'élimination des cellules administrées mais également à l'élimination des cellules voisines présentant les antigènes, notamment tumoraux, susceptibles d'être reconnus par lesdites cellules effectrices cytotoxiques activées.

---

L'invention concerne par ailleurs l'utilisation d'un matériel biologique tel que décrit ci-dessus pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement ou à la prévention de cancers ou d'infections virales. Plus particulièrement, l'invention porte sur l'utilisation d'une séquence d'acide nucléique contenant au moins un gène d'intérêt thérapeutique et des éléments assurant l'expression dudit gène *in vivo* dans des cellules cibles génétiquement modifiées par une dite séquence d'acide nucléique, ledit gène d'intérêt thérapeutique codant pour tout ou partie d'un anticorps exprimé à la surface de ladite cellule cible et capable de se fixer à un polypeptide présent à la surface d'une cellule effectrice cytotoxique ou d'un lymphocyte T helper et impliqué dans le procédé d'activation d'une telle cellule, pour la préparation

de compositions pharmaceutiques destinées à traiter un mammifère par transfert de gène.

Pour la mise en oeuvre du traitement du mammifère mentionné dans la présente invention, il est possible de  
 5 disposer de compositions pharmaceutiques comprenant un matériel biologique tel que précédemment décrit, avantageusement associé avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable pour l'administration à l'homme ou à l'animal. L'utilisation de tels supports est décrite dans la littérature. Ce véhicule  
 10 pharmaceutiquement acceptable est préférentiellement isotonique, hypotonique ou présente une faible hypertonicité et a une force ionique relativement basse, tel que par exemple une solution de sucrose. Par ailleurs, ladite composition peut contenir des solvants, des véhicules aqueux ou partiellement aqueux tels que  
 15 de l'eau stérile, libre d'agent pyrogène et des milieux de dispersion par exemple. Le pH de ces compositions pharmaceutiques est convenablement ajusté et tamponné selon les techniques conventionnelles.

Selon une variante, l'invention concerne une composition  
 20 pharmaceutique comprenant notamment un matériel biologique comme décrit et un composé protéique naturellement responsable de ou impliqué dans l'activation des cellules effectrices cytotoxiques ou de lymphocytes T helper. Plus particulièrement, un tel composé consistera en une cytokine (The cytokine Handbook, 2eme  
 25 Ed., Ed. A.W. Thomson, Ac. Press, Harcourt Brace & Company) ou une chemokine (Rollins, 1997, Blood, 90, 909-928). De façon préférée, ledit composé sera l'IL2. Dans une variante de mise en oeuvre, le matériel biologique selon la présente invention pourra comporter, en outre, une séquence d'ADN assurant  
 30 l'expression d'un composé impliqué dans l'activation des cellules effectrices cytotoxiques ou de lymphocytes T helper. Dans ce cas, cette séquence peut être contenue dans la séquence d'acide nucléique précédemment décrite ou contenue dans une séquence d'acide nucléique indépendante de celle contenant ledit  
 35 gène d'intérêt thérapeutique (WO 95/09241).

Selon une première possibilité, le médicament peut être administré directement *in vivo* ou par une approche *ex vivo* qui consiste à prélever des cellules cibles au mammifère à traiter, à les transfecter *in vitro* selon l'invention et à les réadministrer audit mammifère.

Le matériel biologique selon l'invention peut être administré *in vivo* notamment sous forme injectable, notamment par voie intratumorale. On peut également envisager une injection par voie intratrachéale, intranasale, épidermique, intraveineuse, intra-artérielle, intramusculaire, intrapleurale, intracérébrale par seringue ou tout autre moyen équivalent. Selon un autre mode de réalisation, on peut utiliser des systèmes adaptés au traitement des voies aériennes ou des muqueuses tels que l'inhalation, l'instillation, ou l'aérosolisation, par voie topique, par administration orale ou tout autre moyen parfaitement connu de l'homme de l'art et applicable à la présente invention. L'administration peut avoir lieu en dose unique ou répétée, une ou plusieurs fois après un certain délai d'intervalle. La voie d'administration et le dosage les mieux appropriés varient en fonction de différents paramètres tels que par exemple l'individu ou la maladie à traiter, ou encore de l'acide nucléique à transférer ou de l'organe/tissus cible.

---

~~L'invention concerne également une cellule de mammifère~~

ne produisant pas naturellement d'anticorps, caractérisée en ce qu'elle est génétiquement modifiée par au moins une séquence d'acide nucléique contenant au moins un gène d'intérêt thérapeutique et des éléments assurant l'expression dudit gène dans ladite cellule, ledit gène d'intérêt thérapeutique codant pour tout ou partie d'un anticorps exprimé à la surface de ladite cellule génétiquement modifiée et en ce que ledit anticorps est capable de se fixer à un polypeptide présent à la surface d'une cellule effectrice cytotoxique ou d'un lymphocyte T helper et impliqué dans le procédé d'activation d'une telle cellule décrit plus haut.

---

Enfin, l'invention concerne un procédé de préparation d'une cellule telle que décrite ci-dessus caractérisé en ce que

l'on introduit dans une cellule de mammifère ne produisant pas naturellement d'anticorps, par tout moyen approprié, au moins une séquence d'acide nucléique contenant au moins un gène d'intérêt thérapeutique et des éléments assurant l'expression dudit gène dans ladite cellule, ledit gène d'intérêt thérapeutique codant pour tout ou partie d'un anticorps exprimé à la surface de ladite cellule génétiquement modifiée et en ce que ledit anticorps est capable de se fixer à un polypeptide présent à la surface d'une cellule effectrice cytotoxique ou d'un lymphocyte T helper et impliqué dans le procédé d'activation d'une telle cellule, puis en ce que l'on sélectionne parmi ces cellules celles génétiquement modifiées par ladite séquence d'acide nucléique.

Les exemples ci-après illustrent l'invention sans la limiter en aucune façon.

Légende de la Figure 1: Test de prolifération sur splénocytes murins (2E5 cellules/puits) activés avec des cellules P815 armées avec les anticorps TR310 et H57-597. Mise en présence pendant 5 jours. Marquage thymidine tritiée 8h. Les résultats sont exprimés en quantité de thymidine tritiée incorporée (10E3 cpm).

## 1 - Méthodes:

### 1- 1 - Construction des virus MVA recombinants

Afin de permettre le clonage des séquences d'acide nucléique codant pour différents anticorps choisis pour leur capacité à activer les lymphocytes T, trois hybridomes différents ont été sélectionnés :

- hybridome TR310 (rat anti-Vb7 murin (IgG2b); ATCC HB-219; I. L. Weissman; fusion myelomes murin/splénocytes rat).

- hybridome H57-597 (hamster anti-TCRab murin (IgG); ATCC HB-218; Kubo et al, 1989, J. Immunology, 142: 2736-2742; fusion myelomes murin/splénocytes hamster).

- hybridome KT3 (rat anti-CD3e murin (IgG2a); Tomonari et

al, 1988, Immunogenetics, 28: 455-458; fusion myelomes murin/splénocytes rat).

Le clonage des séquences codant pour l'intégralité des différentes chaînes lourdes et légères de ces anticorps a été  
 5 réalisé selon deux méthodes différentes à partir des ARN totaux extraits des 3 hybridomes:

a) par RT-PCR à l'aide d'oligonucléotides spécifiques (Bca BEST™ RNA PCRKit, Takara Shuzo Co., Ltd; Frohman et al, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 8998-9002) définis de  
 10 manière à ce qu'ils s'hybrident au niveau des régions conservées des séquences 3' constante et 5' variable codant pour les immunoglobulines correspondantes (voir C. A. Kettleborough et al, 1993, Eur. J. Immunol. 23: 206-211). Plus particulièrement, ces séquences ont été définies à l'aide des informations  
 15 suivantes disponibles sur GeneBank :

Hybridome TR310 et KT3 (chaînes lourdes et légères de rat):

-chaîne lourde de type gamma: Rat anti-acetylcholine receptor antibody gene, rearranged Ig  
 20 gamma-2a chain, VDJC region, complete cds. Author: Agius, M. A. and Bharati, S. 1993. Numéro d'accèsion dans genebank=L22654

-chaîne légère de type kappa: Rat anti-acetylcholine receptor antibody gene, kappa-chain, VJC  
 25 region, complete cds. Author: Agius, M. A. and Bharati, S. 1993. Unpublished. Numéro d'accèsion dans genebank=L22653.

Hybridome H57-597: (chaîne lourde et légère de hamster):

-chaîne lourde de type gamma: Cricetulus migratorius IgG heavy chain mRNA, complete cds. Author:  
 30 Whitters, M. J. and Collins, M. 1995. Immunogenetics. 42(3): 227-228. Numéro d'accèsion dans genebank=U17166.

-chaîne légère de type lambda: Mus Musculus immunoglobulin lambda chain (IgL) mRNA, complete cds. Author: Reidl, L. S. Kinoshita, C. M. and Steinex, L. A. 1992. J. Immunol. 149: 471-480. Numéro d'accèsion dans genebank=M94349.

b) par constructions de banques de cDNA en pBluescript ( Universal Riboclone System, Promega, Madison, USA; Maniatis et al, 1982, Molecular cloning. A laboratory manual. C. S. H. Laboratory, Cold Spring Harbor, New York) et screening de ces  
5 banques avec les fragments amplifiés selon a).

Les chaines ainsi isolées sont sous-clonées par recombinaison dans un virus MVA recombinant renfermant la séquence d'acide nucléique codant pour la région transmembranaire du virus de la rage (Modified Vaccinia Ankara;  
10 Antoine et al, 1998, Virology, 244: 365-396 et demande de brevet français n° FR 97 09152) afin d'obtenir des virus recombinants capables d'exprimer des anticorps fonctionnels capables de reconnaître et de se lier à leur antigène spécifique et exprimés de manière transmembranaire à la surface des cellules  
15 recombinaées.

1 - 2 - Etude *in vitro* de l'effet des anticorps TR310 et H57-597 sur la prolifération de splénocytes murins.

20 Des splénocytes murins (souche DBA/2) ont été stimulés avec des cellules tumorales murines P815HT (souche C57/Bl6; Acres et al, 1993, J. Immunother. 14: 136-143) en présence de l'un ou l'autre des deux anticorps (TR310 et H57-597) purifiés à partir des surnageants d'hybridome correspondant, pendant 1h  
25 à 37°C. La présence à la surface des cellules P815HT de récepteurs à immunoglobulines de type Fc permet le recouvrement desdites cellules avec les anticorps. Après 5 jours d'incubation entre les cellules P815 présentant à leur surface les anticorps sélectionnés et les splénocytes, la prolifération des  
30 lymphocytes T est mesurée par un test d'incorporation de thymidine tritiée (Gimmi et al, 1996, Nat. Med. 12: 1367-1371).

Par ailleurs, lors de cette étude, plusieurs paramètres ont été analysés:

35 a) nombre de cellules P815 présentant à leur surface les anticorps sélectionnés nécessaire à la stimulation ;

b) co-stimulation éventuelle à l'aide d'IL-2 recombinante humaine au jour 4 (100 ng/ml soit 50 UI/ml; R&Dsystems)

1 - 3 - Etude de la réponse Th (T helper) associée à la stimulation des splénocytes par les différents anticorps (TR310 et H57-597) présentés à la surface des cellules P815.

5 Pour évaluer cette réponse, les surnageants du test de prolifération précédent, réalisé en présence d'IL-2 recombinante humaine, ont été prélevés au jour 4 ou 5. La présence dans ces surnageants d'IL-4 (réponse de type Th2) ou d'IFN $\gamma$  (réponse de type Th1) a été mesuré à l'aide de kits spécifiques disponibles dans le commerce, selon les recommandations du fournisseur (Kit  
10 Quantikine, R&D systems).

## 2 - Résultats

2 - 1 - Etude *in vitro* de l'effet des anticorps TR310 et  
15 H57-597 sur la prolifération de splénocytes murins.

### 2 - 1 - 1 - Contrôles

Parallèlement à cette étude, un certain nombre de témoins ont également été analysés.

20 Il s'agit plus particulièrement de mesurer les effets observés dans des conditions identiques au test proprement dit de :

RPMI CT: témoin négatif renfermant le milieu seul.

25 Spléno: témoin négatif renfermant les cellules splénocytes seules.

---

Spléno + P815 +/- IL-2: témoin négatif renfermant les cellules splénocytes + les cellules P815 cibles non armées, en présence ou en absence (+/-) d'IL-2 (100 ng/ml) ajoutée au jour 4.

30 Spléno + P815/R2 +/- IL-2: témoin négatif renfermant les cellules splénocytes + les cellules P815 cibles portant à leur surface un anticorps neutre (non capable d'induire l'activation des lymphocytes) +/- IL-2 (100 ng/ml) ajoutée au jour 4.

---

35 Spléno + ConA: témoin positif correspondant à la stimulation des splénocytes murins à l'aide de la Concanavaline A (10  $\mu$ g/ml) qui est un mitogène murin puissant.

Spléno + PHA-P: témoin positif correspondant à la stimulation des splénocytes murins à l'aide de la



phytohématogluttinine A (1 µg/ml) qui est un mitogène humain puissant.

#### 2 - 1 - 2 - Test

5 P815/TR310 (20000/2000/200)+/-IL-2: Evaluation de la stimulation de splénocytes murins par des cellules P815 cibles portant à leur surface un anticorps TR310 (2E4, 2E3, 2E2 cellules/test) en présence ou non d'IL-2 recombinante humaine à partir de J+4.

10

P815/H57-597 (20000/2000/200)+/-IL-2: Evaluation de la stimulation de splénocytes murins par des cellules P815 cibles portant à leur surface un anticorps H57-597 (2E4, 2E3, 2E2 cellules/test) en présence ou non d'IL-2 recombinante humaine à partir de J+4.

15

Les résultats de stimulation obtenus sont présentés sur la Figure 1. Ces résultats montrent que la présentation d'anticorps «activateurs» de lymphocytes T à la surface des cellules cibles P815 permet l'activation et la prolifération de splénocytes murins (visualisées par l'incorporation de thymidine tritiée). L'ajout d'interleukine-2 recombinante humaine ne semble pas amplifier cette stimulation anticorps-dépendante. Par ailleurs, nous avons également montré que l'activation des lymphocytes telle que mesurée s'accompagne de la lyse des cellules cibles P815.

25

2 - 2 - Etude de la réponse Th (T helper) associée à la stimulation des splénocytes par les différents anticorps (TR310 et H57-597).

30

Les résultats observés sont présentés sur le Tableau 1 suivant qui indique les mesures des dosages de l'IL-4 et de l'IFN $\gamma$  après activation de splénocytes murins par les anticorps TR310 et H57-597 présents à la surface de cellules tumorales murines P815.

35

cellules activatrices	P815 2000 cellules/test	P815-TR310 2000 cellules/test	P815-H57-597 2000 cellules/test
dosage de l'IL-4 produite en pg/ml	0	31	23.5
dosage de l'IFNg produite en pg/ml	0	92.9	162.75

Ces dosages montrent que les anticorps TR310 et H57-597  
 dans un contexte de présentation membranaire induisent les 2  
 5 types de réponse Th1 et Th2 (tableau 1). Les anticorps TR310 et  
 H57-597 sont donc capables lorsqu'ils sont présentés à la  
 surface de cellules tumorales d'activer une réponse de type  
 «helper» Th1 mais aussi Th2 en se liant à leur récepteur  
 membranaire présent à la surface des cellules T CD4+. La  
 10 sécrétion de ces cytokines permet en particulier d'augmenter la  
 réponse immunitaire dirigée contre les cellules tumorales.

REVENDICATIONS

1 - Matériel biologique pour la préparation de compositions pharmaceutiques destinées au traitement de mammifères comprenant :

5           - soit au moins une séquence d'acide nucléique contenant au moins un gène d'intérêt thérapeutique et des éléments assurant l'expression dudit gène *in vivo* dans des cellules cibles destinées à être génétiquement modifiées par ladite séquence d'acide nucléique ;

10           - soit au moins une cellule cible ne produisant pas naturellement des anticorps et génétiquement modifiée *in vitro* par au moins une séquence d'acide nucléique précédente,

15           caractérisé en ce que ledit gène d'intérêt thérapeutique code pour tout ou partie d'un anticorps qui sera exprimé à la surface de ladite cellule cible et en ce que ledit anticorps est capable de se fixer à un polypeptide présent à la surface d'une cellule effectrice cytotoxique ou d'un lymphocyte T helper, et impliqué dans le procédé d'activation d'une telle cellule.

20           2 - Matériel biologique selon la revendication 1 caractérisé en ce que ladite séquence d'acide nucléique est sous la forme d'une séquence d'ADN ou d'ARN nue.

25           3 - Matériel biologique selon la revendication 1 caractérisé en ce que ladite séquence d'acide nucléique est un vecteur permettant le transfert dudit gène d'intérêt thérapeutique dans lesdites cellules cibles.

4 - Matériel biologique selon la revendication 3 caractérisé en ce que ledit vecteur est un vecteur viral.

30           5 - Matériel biologique selon la revendication 4 caractérisé en ce que ledit vecteur viral est un vecteur adénoviral, rétroviral, un poxvirus, notamment dérivé du virus de la vaccine ou du Modifed Virus Ankara (MVA).

6 - Matériel biologique selon la revendication 3 caractérisé en ce que ledit vecteur consiste en au moins une dite séquence d'acide nucléique complexée ou conjuguée à au

moins une molécule ou substance porteuse sélectionnée parmi le groupe consistant en un amphiphile cationique, notamment un lipide cationique, un polymère cationique ou neutre, un composé polaire protique notamment choisi parmi le propylène glycol, le polyéthylène glycol, le glycérol, l'éthanol, la 1-méthyl-L-2-pyrrolidone ou leurs dérivés, et un composé polaire aprotique notamment choisi parmi le diméthylsulfoxyde (DMSO), le diéthylsulfoxyde, le di-n-propylsulfoxyde, le diméthylsulfone, le sulfolane, la diméthylformamide, le diméthylacetamide, la tetraméthylurée, l'acétonitrile ou leurs dérivés.

7 - Matériel biologique selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisé en ce que ladite séquence d'acide nucléique contient un gène codant pour la chaîne lourde d'un anticorps capable de se fixer à un polypeptide présent à la surface d'une cellule effectrice cytotoxique ou d'un lymphocyte T helper, et impliqué dans le procédé d'activation d'une telle cellule, fusionnée avec un polypeptide transmembranaire.

8 - Matériel biologique selon la revendication 7 caractérisé en ce que ladite séquence d'acide nucléique contient en outre un gène codant pour la chaîne légère d'un anticorps capable de se fixer à un polypeptide présent à la surface d'une cellule effectrice cytotoxique ou d'un lymphocyte T helper, et impliqué dans le procédé d'activation d'une telle cellule.

9 - Matériel biologique selon la revendication 7 ou 8 caractérisé en ce que ledit polypeptide transmembranaire est sélectionné parmi le groupe consistant en une glycoprotéine, une lipoprotéine, un récepteur membranaire.

10 - Matériel biologique selon la revendication 9 caractérisé en ce que ledit polypeptide transmembranaire est sélectionné parmi le groupe consistant en la glycoprotéine du virus de la rage, la gp160, le CD4.

11 - Matériel biologique selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisé en ce que ledit polypeptide présent à la surface d'une cellule effectrice cytotoxique ou d'un lymphocyte T helper et impliqué dans le procédé d'activation d'une telle cellule est un récepteur.

12 - Matériel biologique selon la revendication 11 caractérisé en ce que ladite cellule effectrice cytotoxique est sélectionnée parmi le groupe consistant en les macrophages, les lymphocytes T cytotoxiques (TCL) et les cellules tueuses (NK),  
5 ou leurs cellules dérivées.

13 - Matériel biologique selon les revendications 11 et 12 caractérisé en ce que ledit récepteur est sélectionné parmi le groupe consistant en tout ou partie du complexe TCR, plus particulièrement le TCR- $\alpha$ , le TCR- $\beta$  ou le CD3, le CD8, CD4,  
10 CD28, LFA-1, 4-1BB, CD47, CD2, CD9, CD45, CD40, les récepteurs de cytokines, telles que IL-7, IL-4, IL-2, IL-15 ou GM-CSF, le Val4NKT, NKAR, le récepteur Fc.

14 - Matériel biologique selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisé en ce que ladite cellule  
15 cible est une cellule de mammifère tumorale, une cellule de mammifère infectée par un agent pathogène viral ou une cellule de mammifère infectée par un agent pathogène bactérien.

15 - Matériel biologique selon la revendication 1 caractérisé en ce qu'il est constitué par au moins une cellule  
20 cible ne produisant pas naturellement des anticorps, sous une forme permettant leur administration dans l'organisme d'un mammifère ainsi qu'éventuellement leur culture préalable, ladite cellule étant génétiquement modifiée *in vitro* par au moins une  
séquence d'acide nucléique contenant au moins un gène codant  
25 pour tout ou partie d'un anticorps exprimé à la surface de ladite cellule cible et en ce que ledit anticorps est capable de se fixer à un polypeptide présent à la surface d'une cellule effectrice cytotoxique ou d'un lymphocyte T helper, et impliqué dans le procédé d'activation d'une telle cellule.

30 16 - Matériel biologique selon la revendication 15 caractérisé en ce que lesdites cellules cibles proviennent du mammifère à traiter.

17 - Matériel biologique selon la revendication 15 caractérisé en ce que lesdites cellules cibles proviennent d'un  
35 autre mammifère que celui à traiter et ont subi un traitement les rendant compatibles.

18 - Matériel biologique selon l'une des revendications 1 à 17, caractérisé en ce qu'il comporte, en outre, au moins une séquence d'ADN assurant l'expression d'un composé impliqué dans l'activation des cellules effectrices cytotoxiques ou de lymphocytes T helper.

19 - Utilisation d'un matériel biologique selon l'une des revendications 1 à 18 pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement ou à la prévention de cancers ou d'infections virales.

20 - Utilisation d'une séquence d'acide nucléique contenant au moins un gène d'intérêt thérapeutique et des éléments assurant l'expression dudit gène *in vivo* dans des cellules cibles génétiquement modifiées par une dite séquence d'acide nucléique, ledit gène d'intérêt thérapeutique codant pour tout ou partie d'un anticorps exprimé à la surface de ladite cellule cible et capable de se fixer à un polypeptide présent à la surface d'une cellule effectrice cytotoxique ou d'un lymphocyte T helper, et impliqué dans le procédé d'activation d'une telle cellule, pour la préparation de compositions pharmaceutiques destinées à traiter un mammifère par transfert de gène.

21 - Composition pharmaceutique comprenant un matériel biologique selon l'une des revendications 1 à 18, ~~avantageusement en association avec un véhicule~~ pharmaceutiquement acceptable.

22 - Composition pharmaceutique selon la revendication 21, comprenant un matériel biologique selon l'une des revendications 15 à 17 et un composé naturellement responsable de l'activation des cellules effectrices cytotoxiques ou de lymphocytes T helper.

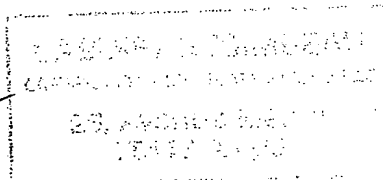
23 - Composition pharmaceutique selon la revendication 22, caractérisée en ce que ledit composé est une cytokine ou une chemokine.

24 - Cellule de mammifère ne produisant pas naturellement d'anticorps, caractérisée en ce qu'elle est génétiquement modifiée par au moins une séquence d'acide nucléique contenant

au moins un gène d'intérêt thérapeutique et des éléments assurant l'expression dudit gène dans ladite cellule, ledit gène d'intérêt thérapeutique codant pour tout ou partie d'un anticorps exprimé à la surface de ladite cellule génétiquement  
5 modifiée et en ce que ledit anticorps est capable de se fixer à un polypeptide présent à la surface d'une cellule effectrice cytotoxique ou d'un lymphocyte T helper, et impliqué dans le procédé d'activation d'une telle cellule.

25 - Procédé de préparation d'une cellule selon la  
10 revendication 22, caractérisé en ce que l'on introduit dans une cellule de mammifère ne produisant pas naturellement d'anticorps, par tout moyen approprié, au moins une séquence d'acide nucléique contenant au moins un gène d'intérêt  
15 thérapeutique et des éléments assurant l'expression dudit gène dans ladite cellule, ledit gène d'intérêt thérapeutique codant pour tout ou partie d'un anticorps exprimé à la surface de ladite cellule génétiquement modifiée et en ce que ledit  
20 anticorps est capable de se fixer à un polypeptide présent à la surface d'une cellule effectrice cytotoxique ou d'un lymphocyte T helper, et impliqué dans le procédé d'activation d'une telle cellule, puis en ce que l'on sélectionne parmi ces cellules celles génétiquement modifiées par ladite séquence d'acide nucléique.

ORIGINAL



au moins un gène d'intérêt thérapeutique et des éléments assurant l'expression dudit gène dans ladite cellule, ledit gène d'intérêt thérapeutique codant pour tout ou partie d'un anticorps exprimé à la surface de ladite cellule génétiquement  
5 modifiée et en ce que ledit anticorps est capable de se fixer à un polypeptide présent à la surface d'une cellule effectrice cytotoxique ou d'un lymphocyte T helper, et impliqué dans le procédé d'activation d'une telle cellule.

25 - Procédé de préparation d'une cellule selon la  
10 revendication 24, caractérisé en ce que l'on introduit dans une cellule de mammifère ne produisant pas naturellement d'anticorps, par tout moyen approprié, au moins une séquence d'acide nucléique contenant au moins un gène d'intérêt thérapeutique et des éléments assurant l'expression dudit gène  
15 dans ladite cellule, ledit gène d'intérêt thérapeutique codant pour tout ou partie d'un anticorps exprimé à la surface de ladite cellule génétiquement modifiée et en ce que ledit anticorps est capable de se fixer à un polypeptide présent à la surface d'une cellule effectrice cytotoxique ou d'un lymphocyte  
20 T helper, et impliqué dans le procédé d'activation d'une telle cellule, puis en ce que l'on sélectionne parmi ces cellules celles génétiquement modifiées par ladite séquence d'acide nucléique.

---

---



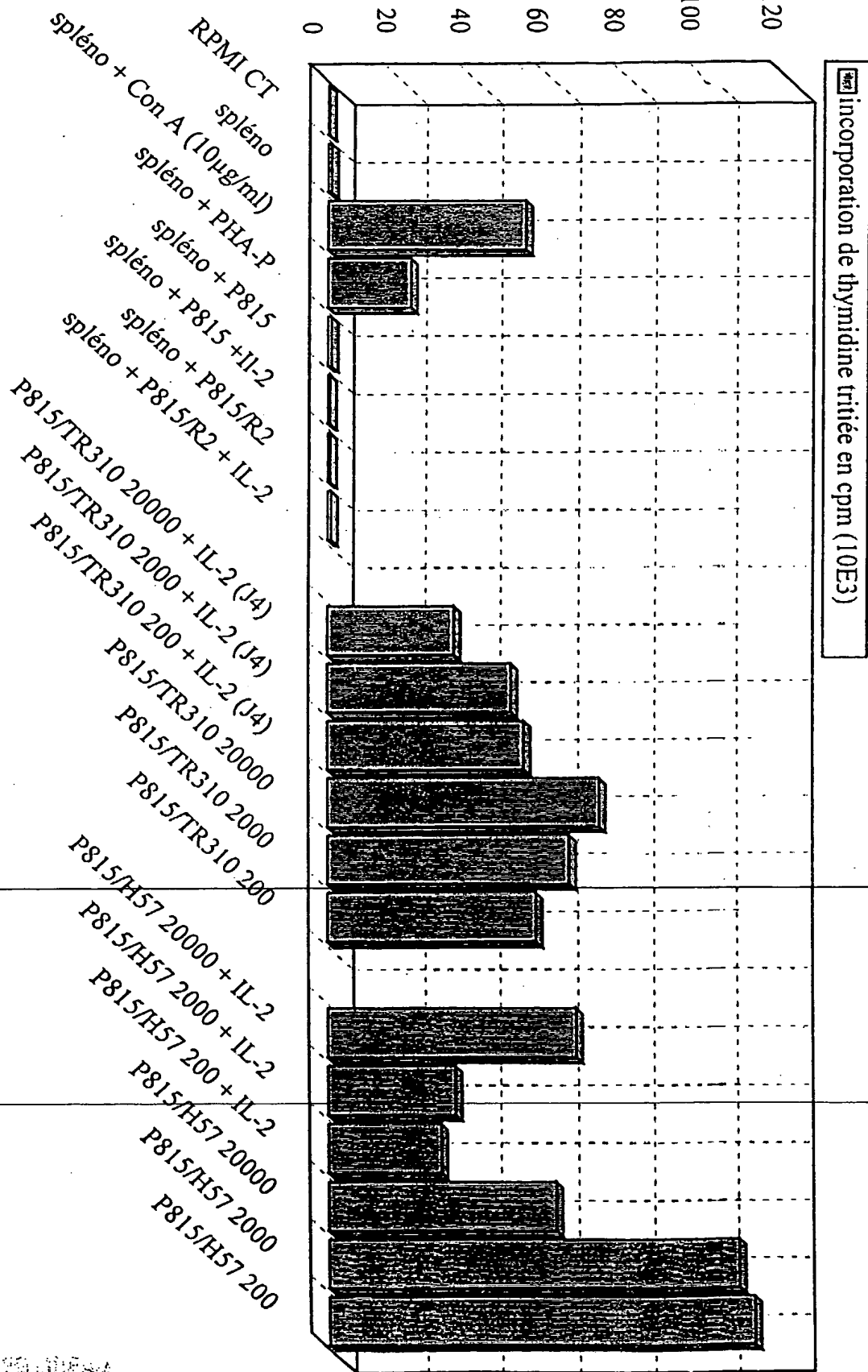


Figure 1

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**